

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/004881

International filing date: 14 March 2005 (14.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-070986  
Filing date: 12 March 2004 (12.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 28 April 2005 (28.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

14. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 3月12日

出願番号  
Application Number: 特願2004-070986

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号  
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人  
Applicant(s): キヤノン株式会社

J P 2004-070986

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

2005年 4月14日

小川

洋

【書類名】 特許願  
【整理番号】 259197  
【提出日】 平成16年 3月12日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12Q 1/68  
【発明者】  
【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内  
【氏名】 岡本 尚志  
【特許出願人】  
【識別番号】 000001007  
【氏名又は名称】 キヤノン株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100123788  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 宮崎 昭夫  
【電話番号】 03-3585-1882  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100106297  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 伊藤 克博  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100106138  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 石橋 政幸  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 201087  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的で且つ連續な塩基配列の複数を有する一本鎖核酸(A鎖)と、該A鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸(B鎖)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連續的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

(4) 前記A鎖および前記B鎖を鑄型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記B鎖伸長用プライマーと、を用いてPCR反応を行う工程。

(5) PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖に相当する核酸と、伸長増幅され、基板に結合していないB鎖に相当する核酸と、のハイブリッド体を形成させる工程。

(6) 前記ハイブリッド体を前記アレイの各々のプライマー固定領域において検出することにより、前記検出対象としての塩基配列を検出する工程。

## 【請求項2】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的で且つ連續な塩基配列の複数を有する一本鎖核酸(A鎖)と、該A鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸(B鎖)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の5'末端と、該5'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連續的な塩基配列を有する核酸をA鎖伸長用プライマーとして用意し、前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連續的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

(4) 前記A鎖および前記B鎖を鑄型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記A鎖伸長用プライマー及びB鎖伸長用プライマーと、を用いてPCR反応を行う工程。

(5) PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖に相当する核酸と、伸長増幅され、基板に結合していないB鎖に相当する核酸と、のハイブリッド体を形成させる工程。

(6) 前記ハイブリッド体を前記アレイの各々のプライマー固定領域において検出することにより、前記検出対象としての塩基配列を検出する工程。

## 【請求項3】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的且つ連續な塩基配列を有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群：A<sub>1</sub>鎖～A<sub>n</sub>鎖：n≥2)と、該A鎖群の各鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸群(B鎖群：B<sub>1</sub>鎖～B<sub>n</sub>鎖：n≥2)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連續的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有

する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB<sub>1</sub>鎖～PB<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意する工程。

(4) 前記A鎖群および前記B鎖群の各鎖を鋳型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記PB鎖群の複数のB鎖伸長用プライマーと、を用いてPCR反応を行う工程。

(5) PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖群に相当する核酸と、伸長増幅され、基板に結合していないB鎖群に相当する核酸とのハイブリッド体を形成させる工程。

(6) 前記ハイブリッド体を前記アレイの各々のプライマー固定領域において検出することにより、前記検出対象としての塩基配列を検出する工程。

#### 【請求項4】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列を有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群：A<sub>1</sub>鎖～A<sub>n</sub>鎖：n≥2)と、該A鎖群の各鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸群(B鎖群：B<sub>1</sub>鎖～B<sub>n</sub>鎖：n≥2)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、5'末端と、該5'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列を有する核酸をA鎖伸長用プライマー(PA鎖群：PA<sub>1</sub>鎖～PA<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意し、前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB<sub>1</sub>鎖～PB<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意する工程。

(4) 前記A鎖群および前記B鎖群の各鎖を鋳型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記PA鎖群および前記PB鎖群の各伸長用プライマーと、を用いてPCR反応を行う工程。

(5) PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖群に相当する核酸と、伸長増幅され、基板に結合していないB鎖群に相当する核酸とのハイブリッド体を形成させる工程。

(6) 前記ハイブリッド体を前記アレイの各々のプライマーの固定領域において検出することにより、前記検出対象としての塩基配列を検出する工程。

#### 【請求項5】

前記B鎖伸長用プライマーが標識されており、前記ハイブリッド体の検出が該標識を用いて行われるものである請求項1～4のいずれかに記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項6】

前記標識が蛍光色素である請求項5に記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項7】

前記ハイブリッド体の検出が二本鎖核酸に作用するインターラーカーあるいはグルーブバインダーとしての蛍光色素を用いて行われるものである請求項1～4のいずれかに記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項8】

前記ハイブリッド体の検出において、該蛍光色素を共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察する工程をさらに有する請求項6または7に記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項9】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列の複数を有する一本鎖核酸(A鎖)と、該A鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸(B鎖)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマー

として用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

(4) 前記A鎖および前記B鎖を鑄型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記B鎖伸長用プライマーと、を用い、ヌクレオチドモノマーの少なくとも1種の一部、もしくは、全部を標識してPCR反応を行う工程。

(5) 前記基板に結合したプローブから伸長増幅したA鎖に相当する核酸を、該核酸に取り込まれた標識を介して検出する工程。

#### 【請求項10】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的で且つ連続な塩基配列の複数を有する一本鎖核酸(A鎖)と、該A鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸(B鎖)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の5'末端と、該5'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列を有する核酸をA鎖伸長用プライマーとして用意し、前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

(4) 前記A鎖および前記B鎖を鑄型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記A鎖伸長用プライマー及びB鎖伸長用プライマーと、を用い、ヌクレオチドモノマーの少なくとも1種の一部、もしくは、全部を標識してPCR反応を行う工程。

(5) 前記基板に結合したプローブから伸長増幅したA鎖に相当する核酸を、該核酸に取り込まれた標識を介して検出する工程。

#### 【請求項11】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列を有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群：A<sub>1</sub>鎖～A<sub>n</sub>鎖：n≥2)と、該A鎖群の各鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸群(B鎖群：B<sub>1</sub>鎖～B<sub>n</sub>鎖：n≥2)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB<sub>1</sub>鎖～PB<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意する工程。

(4) 前記A鎖群および前記B鎖群の各鎖を鑄型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記PB鎖群の複数のB鎖伸長用プライマーと、を用い、ヌクレオチドモノマーの少なくとも1種の一部、もしくは、全部を標識してPCR反応を行う工程。

(5) 前記基板に結合したプローブから伸長増幅したA鎖に相当する核酸を、該核酸に取り込まれた標識を介して検出する工程。

#### 【請求項12】

下記工程を有する核酸の検出方法。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列を有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群

：A<sub>1</sub>鎖～A<sub>n</sub>鎖：n≥2)と、該A鎖群の各鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸群(B鎖群：B<sub>1</sub>鎖～B<sub>n</sub>鎖：n≥2)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、5'末端と、該5'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列を有する核酸をA鎖伸長用プライマー(PA鎖群：PA<sub>1</sub>鎖～PA<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意し、前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB<sub>1</sub>鎖～PB<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意する工程。

(4) 前記A鎖群および前記B鎖群の各鎖を鋳型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記PA鎖群およびPB鎖群の各プライマーと、を用い、ヌクレオチドモノマーの少なくとも1種の一部、もしくは、全部を標識してPCR反応を行う工程。

(5) 前記基板に結合したプローブから伸長増幅したA鎖に相当する核酸を、該核酸に取り込まれた標識を介して検出する工程。

#### 【請求項13】

前記PCR反応後に、前記基板上の反応液を洗浄除去する工程を更に有する請求項9～12のいずれかに記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項14】

前記標識が蛍光色素である請求項9～13のいずれかに記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項15】

前記標識の検出において、該蛍光色素を共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察する工程を更に有する請求項14に記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項16】

少なくともPCR反応および核酸の検出を、プライマーアレイが同一の容器中に存在する形態でおこなう請求項1～15のいずれかに記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項17】

PCR反応および核酸の検出を、それぞれ同一の手段を用いて継続的に観察しながらおこなう請求項16に記載の核酸の検出方法。

#### 【請求項18】

請求項16または17に記載の核酸の検出方法を可能とする少なくともPCR反応容器および検出手段を具備する核酸の検出装置。

#### 【請求項19】

請求項1～17のいずれかに記載のプライマーアレイ、PCR反応試薬、および核酸検出用試薬を有する、核酸検出キット。

#### 【請求項20】

検出する核酸が二本鎖核酸を形成する場合において、前記核酸検出用試薬が、二本鎖核酸に作用するインターラーカレーターまたはグループバインダーとしての蛍光色素である請求項19に記載の核酸検出キット。

【書類名】明細書

【発明の名称】核酸検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は核酸検出方法、特にプライマーアレイ及びPCR法を用いた核酸検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトをはじめとするさまざまな生物のゲノム等の塩基配列解析が精力的に進められ、その結果として、遺伝子を解析して、遺伝病、癌、感染症、生活習慣病等の診断、治療方針の決定、治療後の管理、予後予想等が行われるようになってきた。また、別の分野では、同様に遺伝子を解析することにより、食肉、穀物等の食品の流通管理も行われようとしている。

【0003】

これらの遺伝子解析に用いられる技術として、1990年代の後半から特に注目されてきている技術の一つとして、固相の基板に複数の例えはDNAプローブ、オリゴヌクレオチドプローブ、cDNA等の核酸を搭載した核酸アレイがあげられる。核酸アレイはまた、DNAアレイ、オリゴヌクレオチドアレイ、cDNAアレイ等とも呼ばれることもあり、場合によっては、核酸チップ、DNAチップのようにも呼ばれる。核酸アレイそのもの、あるいは核酸アレイを用いた遺伝子解析技術は、近年ではかなり一般的に知られてきているのでここで詳細は説明しないが、基本的には多数多種の固相ハイブリダイゼーションを同時にを行うことが可能であるという利点がある。

【0004】

一方、遺伝子解析に関する重要な技術として位置付けられてきたPCR(ポリメラースチエインリアクション)法は、現在でも色褪せることなく、遺伝子解析の際に最も一般的に用いられる技術の一つとなっている。

【0005】

PCR法は発明以来、幾つかの進歩進化を遂げている。例えは、旧来は一種類の遺伝子、もしくは一種類の塩基配列に対して、增幅を必要とする塩基配列を挟む形で二種類のプライマーを用いてPCRを行っていたが、近年では、複数の遺伝子、もしくは複数の塩基配列の異なる塩基配列を含む增幅を必要とする塩基配列を挟んだ二種類のプライマーを用いてPCRが行われるようになった。すなわち、たかだか二種類の(共通の)プライマーで複数の遺伝子等の增幅が可能となるのである。このようなPCR法は一般的にユニバーサルPCRと呼ばれ、例えは、感染症の引き起こす複数の起炎菌を同定する場合に、特定のrRNA、例えは16s rRNA遺伝子の各起炎菌にユニークな塩基配列部分を含む塩基配列を挟み、且つ、各起炎菌に共通な塩基配列を有するプライマーでPCRを行った後に、上記ユニークな塩基配列を検出することにより各起炎菌を特定、検出可能となる。この方法の利点は複数の遺伝子等それぞれにPCRを行う必要がないところにある。

【0006】

他方、マルチプレックスPCRという手法も開発されている。これは、ひとつのバッチで複数の遺伝子等を、それぞれ異なるプライマーセットで增幅しようとするものである。この手法には、プライマーの鎖長、塩基配列、及びPCR条件の設計、設定等に難しさはあるものの、基本的に複数、多種のPCRを同時にを行うことが可能であり、また、同一のバッチで反応を行うことにより場合によっては検出の定量性の向上が期待できる。

【0007】

さらに以上述べてきたチップ技術とPCR法を組み合わせた手法も提案されている。

【0008】

二種のオリゴヌクレオチドからなるPCRプライマーの一セットを核酸アレイの一つのマトリクスに固定して、複数のPCRを一枚の固相上で行う、いわゆる固相PCRの一手法が開示されている(特許文献1参照)。この手法によれば、PCR後の核酸アレイとハイ

プリダイゼーション条件におくことによって、マトリクス上で増幅した二種の増幅産物が互いに逆U字型にハイブリッドを形成する。このハイブリッドを例えれば蛍光インターラーカレーター色素を用いて検出することにより、検出対象の例えれば遺伝子を同定、検出することが可能となる。

#### 【0009】

また、複数のウェルを有するマイクロプレートでの固相PCR法が示されている（非特許文献1参照）。すなわち、マイクロプレートのウェルの表面にPCRのプライマーセットのうち、一方を共有結合で固定し、ウェル内において錆型核酸および双方のプライマーを用いてPCRを行う方法である。検出はウェル表面に固定化したプライマーから伸長したPCR増幅産物を別途検出プローブを用いて行う。

【特許文献1】特開2001-299346号公報

【非特許文献1】Nalge Nunc International社発行 TECH NOTE Vol.3 No.16

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

以上、本発明に関わる従来技術、すなわち、遺伝子検出技術、核酸アレイ技術、PCR法、固相PCR法について概説した。

#### 【0011】

上記固相PCR法は、基本的にひとつのPCR反応を、ひとつのマトリクス、またはひとつずつウェルにおいて行うものであって、すでに述べたユニバーサルPCRあるいはマルチプレックスPCRに適用することは難しい。また、特許文献1に記載の方法では最終的なハイブリッドの形成が微小領域で逆U字型に行われるためにハイブリッド形成に立体的な制限がある。また、非特許文献1に記載の方法は、マイクロプレートのウェル中の反応であるために、核酸アレイでの反応に比較して反応数に制限があり、反応液量も多量に必要となり、検出の効率も改良する余地がありうる。さらにこれらの技術の検出は蛍光インターラーカレーターを用いたり、別の検出プローブを用いるなど、増幅後に別途のステップを必要とするものであった。

#### 【0012】

以上のような状況に鑑み、本発明は多種多量の遺伝子検出を簡便、高効率、高精度に行うことを可能とする固相PCR法に関するものであり、医療分野における診断、治療、予後予想、あるいは食品分野の流通管理など、遺伝子検出をベースとした分野で広範囲に利用されうる核酸の検出方法を提供することを目的とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0013】

上記の目的は以下の本発明によって達成される。

#### 【0014】

すなわち、本発明にかかる核酸検出方法の第1態様は、以下の工程を有することを特徴とする。

(1) 検出対象としての部分的で且つ連続な塩基配列の複数を有する一本鎖核酸(A鎖)と、該A鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸(B鎖)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

(4) 前記A鎖および前記B鎖を錆型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記B鎖伸長用プライマーと、を用いてPCR反応を行う工程。

(5) PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖に相当する核酸と、伸長増

幅され、基板に結合していないB鎖に相当する核酸と、のハイブリッド体を形成させる工程。

(6) 前記ハイブリッド体を前記アレイの各々のプライマー固定領域において検出することにより、前記検出対象としての塩基配列を検出する工程。

上記手法により核酸アレイ上でのユニバーサルPCRが可能となる。

#### 【0015】

本発明の核酸の検出方法の第2の態様は、以下の工程を有することを特徴とする。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列を有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群：A1鎖～An鎖：n≥2)と、該A鎖群の各鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸群(B鎖群：B1鎖～Bn鎖：n≥2)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB1鎖～PBn鎖：n≥2)として用意する工程。

(4) 前記A鎖群および前記B鎖群の各鎖を鋳型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記PB鎖群の複数のB鎖伸長用プライマーと、を用いてPCR反応を行う工程。

(5) PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖群に相当する核酸と、伸長増幅され、基板に結合していないB鎖群に相当する核酸と、のハイブリッド体を形成させる工程。

(6) 前記ハイブリッド体を前記アレイの各々のプライマー固定領域において検出することにより、前記検出対象としての塩基配列を検出する工程。

#### 【0016】

上記の検出方法では、各A鎖は複数の検出対象としての塩基配列を一ヶ所以上有することができる。

#### 【0017】

以上の方法により、従来技術では不可能であった、核酸アレイを用いた、固相ユニバーサルPCR、固相マルチプレックスPCR、さらに、ユニバーサルであり且つマルチプレックスである固相PCRが可能となる。

#### 【0018】

更に、本発明の核酸の検出方法の第3の態様は、以下の工程を有することを特徴とする。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列の複数を有する一本鎖核酸(A鎖)と、該A鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸(B鎖)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

(4) 前記A鎖および前記B鎖を鋳型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記B鎖伸長用プライマーと、を用い、スクレオチドモノマーの少なくとも1種の一部、もしくは、全部を標識してPCR反応を行う工程。

(5) 前記基板に結合したプローブから伸長増幅したA鎖に相当する核酸を、該核酸に取り込まれた標識を介して検出する工程。

## 【0019】

更に、本発明の核酸の検出方法の第4の態様は、以下の工程を有することを特徴とする。

(1) 検出対象としての部分的且つ連続な塩基配列を有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群：A<sub>1</sub>鎖～A<sub>n</sub>鎖：n≥2)と、該A鎖群の各鎖に対して相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸群(B鎖群：B<sub>1</sub>鎖～B<sub>n</sub>鎖：n≥2)とを用意する工程。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB<sub>1</sub>鎖～PB<sub>n</sub>鎖：n≥2)として用意する工程。

(4) 前記A鎖群および前記B鎖群の各鎖を鋳型として、前記基板上に固定されたプライマーと、前記PB鎖群の複数のB鎖伸長用プライマーと、を用い、ヌクレオチドモノマーの少なくとも1種の一部、もしくは、全部を標識してPCR反応を行う工程。

(5) 前記基板に結合したプローブから伸長増幅したA鎖に相当する核酸を、該核酸に取り込まれた標識を介して検出する工程。

## 【0020】

上記の検出方法では、各A鎖は複数の検出対象としての塩基配列を一ヶ所以上有することができる。

## 【0021】

これらの第3及び第4の態様は、検出の工程をより簡便するために、PCR反応の際に用いられるヌクレオチドモノマーの少なくとも1つの一部もしくは全部に標識モノマーを利用することをその特徴の一つとする。これらの態様にかかる方法によって、PCR後にハイブリッド形成を行うという二段階の工程を経ることなく、PCR後に直ちに検出を行うことが可能な固相PCR、あるいは、PCR後に直ちに検出を行うことが可能な固相ユニバーサルPCR、固相マルチプレックスPCR、さらに、ユニバーサルであり且つマルチプレックスである固相PCRが可能となる。

## 【0022】

更に、上記本発明の第1～第4の態様は、基板に固定しないプライマーとしてA鎖の5'端側に最も近い検出対象としての塩基配列よりも5'端部側の領域から選択した塩基配列と同じ塩基配列を有する核酸(A鎖伸長用プライマー)を上記のB鎖伸長用プライマーに付加して用いることで、PCRでの目的塩基配列の増幅効率を上げることができることを特徴とする。

## 【0023】

また、上記本発明の第1～第4のさらなる態様は、PCR反応および検出を、プライマーアレイが同一の容器中に存在する形態で行うことを特徴とし、さらに、該PCR反応および検出を、同一の手段を用いて継続的に観察しながら行うことができる。

## 【0024】

本発明のさらなる態様は、上記本発明の検出方法を可能とする、少なくともPCR反応容器および検出手段を具備する検出装置を特徴とする。

## 【0025】

また、上記のプライマーアレイ、PCR反応試薬、および核酸検出用試薬を有する、核酸検出キットとして提供することも本発明に含まれる。

## 【0026】

なお、上記の各態様にかかる方法におけるnは同数(整数)である。

## 【発明の効果】

## 【0027】

本発明により核酸アレイを用いる、固相ユニバーサルPCR、固相マルチプレックスPCR、さらに、ユニバーサルであり且つマルチプレックスである固相PCRが可能となった。またPCR時に標識ヌクレオチドモノマーを用いることにより、PCR後に直ちに検出を行うことが可能な固相PCR、あるいは、PCR後に直ちに検出を行うことが可能な固相ユニバーサルPCR、固相マルチプレックスPCR、さらにユニバーサルであり且つマルチプレックスである固相PCRが可能となった。

#### 【0028】

すなわち、本発明によれば、多種多量の遺伝子検出を簡便、高効率、高精度に行うことが可能となった。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0029】

本発明の核酸検出方法の第1の態様は、上記の(1)～(6)の工程を有する。この方法によりプライマーアレイ上でのユニバーサルPCRが可能となる。

#### 【0030】

この場合、検出対象としての塩基配列は、例えば二本鎖核酸からなる遺伝子であればセンス側の塩基配列でもアンチセンス側の塩基配列でも基本的には同じである。アンチセンス側の配列を知ることによってその相補的であるセンス側の塩基配列(すなわち遺伝子の塩基配列)を知ることができるのは自明である。

#### 【0031】

各工程における各操作は公知の方法を用いて行うことができる。最終ステップの検出工程では、形成されたハイブリッド体を検出可能な手法であれば如何なる手法を用いることができる。例えば、二本鎖核酸に作用して蛍光を発光、あるいは、増強する蛍光インターラーカレーター色素、蛍光グループバイNDER色素を用いる検出方法が利用できる。あるいは、工程(4)に記載のプライマーとして用いる、A鎖の検出対象としての塩基配列の3'末端より、さらに3'側に位置する塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸(B鎖伸長用プライマーであり、A鎖3'側に由来するプライマーである。ここで3'側に由来することは3'末端に最も近い検出対象としての塩基配列よりも更に3'末端側に位置する部分に由来することを意味する)を、例えば、フルオロセイン、テトラメチルローダミン、Cy3、Cy5等の蛍光色素、あるいはラジオアイソトープラベルする手法を採用することも可能である。なお、蛍光色素を用いた場合には、蛍光顕微鏡を用いて観察することができる、例えば共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察する工程を更に有することができる。

#### 【0032】

この方法では、PCR反応に用いるプライマーセットのうち、一方のプライマーを固相に固定し、他方(B鎖伸長用プライマー)を反応液中に溶解して使用する。このB鎖伸長用プライマーは各検出対象としての塩基配列の増幅に対して共通のプライマーとしての機能を有する。更に、第1の態様の(2)及び(3)の工程を以下のように変更することができる。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖の5'末端と、該5'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列を有する核酸をA鎖伸長用プライマーとして用意し、前記A鎖の3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマーとして用意する工程。

#### 【0033】

すなわち、B鎖伸長用プライマーに加えて、A鎖の検出対象としての塩基配列の5'末端より、さらに5'側に塩基配列の連続した一部と同じ塩基配列を有する核酸(A鎖伸長用プライマーであり、A鎖5'側に由来するプライマーである：ここで5'側由来とは5

、末端に最も近い検出対象としての塩基配列よりも更に5'末端側に位置する部分に由来することを意味する)を反応溶液中に溶解して第2の共通プライマーとして併用することも可能である。場合によってはこちらの併用方法のほうが増幅の効率がよい。

#### 【0034】

なお、本方法において場合によっては、基板上の反応液を除去する洗浄操作によって、上記ハイブリッド体以外の、例えば鑄型核酸、PCR反応に用いたヌクレオチドモノマー、酵素等を除去する工程を含むことができる。

#### 【0035】

これらの方法は上述のようにユニバーサルPCRに関するものであるが、先に記載した第2の態様にかかる本発明の核酸の検出方法は先に記載した工程(1)～(6)の工程を有する。この方法によりマルチプレックスPCRが可能となる。

#### 【0036】

この場合、ハイブリッド体の検出には前述の方法と同様の検出方法を用いることができる。検出対象としての部分的かつ連続的な塩基配列を一ヶ所以上有する複数種の一本鎖核酸(A鎖群：A1鎖～An鎖：n≥2)に対して上記検出方法を用いることができる。また、第2の態様の(2)及び(3)の工程を以下のように変更することもできる。

(2) 前記複数の検出対象としての塩基配列ごとに該塩基配列を有する核酸をプライマーとして用意し、各プライマーを別々に基板上の独立した領域に固定して、前記検出対象としての塩基配列のそれぞれがこれらの固定領域に分配されたプライマーアレイを用意する工程。

(3) 前記A鎖群の各鎖ごとに、5'末端と、該5'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列を有する核酸をA鎖伸長用プライマー(PA鎖群：PA1鎖～PA n鎖：n≥2)として用意し、前記A鎖群の各鎖ごとに、3'末端と、該3'末端側に位置する検出対象としての塩基配列と、の間の領域内の部分的且つ連続的な塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する核酸をB鎖伸長用プライマー(PB鎖群：PB1鎖～PB n鎖：n≥2)として用意する工程。

#### 【0037】

すなわち、増幅反応時に、上記A鎖群の検出を対象とする塩基配列の5'末端より、さらに5'側に塩基配列の連続した一部と同じ塩基配列を有する複数の核酸(PA鎖群：PA1鎖～PA n鎖：n≥2)をPB鎖群とともに反応液中に溶解して、それぞれの共通プライマーとして使用することも可能である。場合によってはこちらの方法の方が増幅の効率がよい。

#### 【0038】

以上の方法により、核酸アレイを用いた、固相ユニバーサルPCR、固相マルチプレックスPCR、さらにユニバーサルであり且つマルチプレックスである固相PCRが可能となる。

#### 【0039】

図1として、上記の方法を、A鎖が3つの検出対象としての塩基配列を有する場合について説明した模式図を示す。図1におけるA鎖には、primer 1～primer 3が3'から5'方向に配置されており、A鎖の相補鎖であるB鎖上に、A鎖の3'末端に最も近いprimer 1の3'末端よりも更に3'末端側の領域から選択された部分に相補的な配列の部分として共通プライマー(univ. anti-sense primer)が設定されている。また、A鎖の5'末端に最も近いprimer 3の5'末端よりも更に5'末端側の領域から選択された部分と同じ配列の部分として共通プライマー(univ. sense primer)が設定されている。基板にはprimer 1～primer 3の部分と同じ配列からなるプライマーがそれぞれ固定された領域が設けられており、図1ではプライマーが固定された領域が示されている。基板上でPCR反応を行うと、基板上に固定されたプライマーから共通プライマーで規定された位置までの伸長増幅が起きる。図1に示されたプライマーの固定領域では、基板に5'末端で固定されたプライマーの3'末端が共通プライマー(univ. anti-sense primer)で規定される位置まで伸長増幅してA鎖に相当する固定鎖を形成し、B鎖から増幅したB鎖に相当する鎖とこの

固定鎖で二本鎖を形成させることができる。この2本鎖を検出して検出対象としてのA鎖中の塩基配列を同定できる。共通プライマー(univ. sense primer)を更に追加することで、主に、A鎖自体の増幅効果が期待でき、場合によって増幅効率の向上を図ることができる。

#### 【0040】

次に、先に挙げた第3及び第4の態様におけるように、検出の工程をより簡便とするために、PCR反応の際に用いられるヌクレオチドモノマーに標識モノマーを利用することができる。この様子を図2の模式図で示す。すなわち、これまで述べてきた方法全てに適用でき、増幅時にアデニン、グアニン、シトシン、チミンを塩基とする伸長のためのヌクレオチドモノマーの少なくとも一種の一部もしくは全部に標識物質を結合することにより、増幅後、基板に結合したプライマーから伸長した核酸に、上記標識物質が導入される。その結果、前記の方法では起こってきたハイブリダイゼーション以降の工程を省いて検出を行うことが可能となる。本方法における標識物質は特に限定されるものではないが、上述の蛍光色素、ラジオアイソトープが例としてあげられる。第3及び第4の態様における検出工程においても、蛍光色素を用いて標識を行う場合には共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察する工程を更に有することができる。

#### 【0041】

なお、本方法において場合によっては、PCR反応の結果、伸長増幅され、基板に結合したA鎖に相当する核酸以外の、例えば伸長増幅したB鎖に相当する核酸、鑄型核酸、PCR反応に用いたヌクレオチドモノマー、酵素等の除去を行ってもよい。

#### 【0042】

本方法によって、前記従来技術の要改良点の一つであったPCR後にハイブリッド形成を行うという二段階の工程を経ることなく、PCR後に直ちに検出を行うことが可能な固相PCR、あるいは、PCR後に直ちに検出を行うことが可能な固相ユニバーサルPCR、固相マルチプレックスPCR、さらに、ユニバーサルであり且つマルチプレックスである固相PCRが可能となる。

#### 【0043】

##### (その他の実施形態)

上記で説明した検出方法を実現するための装置は、本発明の範囲に含まれうる。

#### 【0044】

上記の示した方法において、少なくともPCR反応および検出をプライマーアレイが同一の容器中に存在する形態で行うと、装置等の簡略化が可能となる点、また、以下に述べるように、PCR反応及び検出を同一の検出手段を用いて継続的に観察しながら行うことが可能となる点で好ましい。ここで、PCR反応および検出を同一の検出手段を用いて継続的に観察しながら行うことは、PCR増幅の過程をモニターできることから、いわゆるリアルタイムPCRを可能とする、すなわち、定量性の高い検出を行うことができる点で好ましい様態である。このような検出方法を可能とするPCR反応容器および検出手段を具備した装置は、本発明を実現する上で好適な形態である。

#### 【0045】

また、上記のプライマーアレイ、PCR反応試薬、検出手用試薬を有する核酸検出キットとして提供することも本発明に含まれる。さらに、上述のPCR反応容器を具備させても良く、PCR反応容器をカートリッジ形状にしても良い。また、検出する核酸が2本鎖核酸を形成する場合においては、上記核酸検出キットの検出手用試薬が2本鎖核酸に作用するインターラーカーまたはグルーブバイインダーとしての蛍光色素であると良い。

#### 【実施例】

#### 【0046】

以下、実施例をあげて本発明を具体的に説明する。

#### 【0047】

実施例1 (固相ユニバーサルPCR)

(1) プライマーの準備

固相ユニバーサルPCRの検出対象を大腸菌(Escherichia coli: ATCC#11775)の16sリボゾーマルRNA(rRNA)のゲノムDNAの以下に示す7部分(Ec1~Ec7)のセンス側塩基配列とし、固相固定プライマーとして選択した。

Ec1 5' CTCTGCCATCGGATGTGCCCA 3' (配列番号: 1)  
 Ec2 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' (配列番号: 2)  
 Ec3 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3' (配列番号: 3)  
 Ec4 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3' (配列番号: 4)  
 Ec5 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3' (配列番号: 5)  
 Ec6 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3' (配列番号: 6)  
 Ec7 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' (配列番号: 7)。

#### 【0048】

これらのプライマーは合成業者(株式会社ベックス)に依頼して合成した。Ec1~Ec7は後述するように固相基板に結合させるために5'側にリンカーを介してチオール(SH)基を結合した。チオール基を結合した構造をEc1を例として以下に示した。

HS(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OP(O<sub>2</sub>)O-dCTCTGCCATCGGATGTGCCCA

また、アンチセンス側配列の共通プライマーの塩基配列として下記塩基配列(EcAP)を選択した：

EcAP 5' ATCCAACCGCAGGTTCCCTAC 3' (配列番号: 8)

EcAPは通常どおり合成した。全てのプライマーの脱保護、精製は定法の基づいて行った。

#### 【0049】

##### (2) 大腸菌ゲノムDNAの抽出

まず、大腸菌標準株を定法に従って培養した。微生物培養液を1.5ml容量のマイクロチューブに1.0ml(OD<sub>600</sub>=0.7)採取し、遠心分離で菌体を回収した(8500rpm、5分間、4℃)。上精を捨てた後、Enzyme Buffer(50mM Tris-HCl: p.H. 8.0、25mM EDTA) 300μlを加え、ミキサーを用いて再懸濁した。再懸濁した菌液は再度遠心分離で菌体を回収した(8500rpm、5分間、4℃)。上精を捨てた後回収された菌体に以下の酵素溶液を加えミキサーを用いて再懸濁した：

Lysozyme	50 μl (20 mg/ml in Enzyme Buffer)
N-Acetyl muramidase SG	50 μl (0.2 mg/ml in Enzyme Buffer)。

#### 【0050】

次に、酵素溶液を加え再懸濁した菌液を、37℃のインキュベーター内で30分間静置し、細胞壁の溶解処理を行った。次いで、核酸精製キット(MagExtractor.Genome-: TOYOB0社製)を用いてゲノムDNAの抽出を行った。

#### 【0051】

具体的には、まず、前処理した微生物懸濁液に溶解・吸着液750μlと磁性ビーズ40μlを加え、チューブミキサーを用いて10分間激しく攪拌した(ステップ1)。

#### 【0052】

分離用スタンド(Magical Trapper)にそのマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま上精を捨てた(ステップ2)。

#### 【0053】

次に洗浄液900μlを加えミキサーで5秒間程度攪拌して再懸濁を行った(ステップ3)。

#### 【0054】

次に、分離用スタンド(Magical Trapper)にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま上精を捨てた(ステップ4)。

#### 【0055】

ステップ3、4を繰り返して2度目の洗浄(ステップ5)を行った後、70%エタノール900μlを加え、ミキサーで5秒間程度攪拌して再懸濁した(ステップ6)。

## 【0056】

次に、分離用スタンド(Magical Trapper)にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブの壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま、上精を捨てた(ステップ7)。

## 【0057】

ステップ6、7を繰り返して70%エタノールによる2度目の洗浄(ステップ8)を行った後、回収された磁性粒子に純水100 $\mu$ lを加え、チューブミキサーで10分間攪拌を行った。

## 【0058】

次に、分離用スタンド(Magical Trapper)にマイクロチューブをセットし、30秒間静置して磁性粒子をチューブ壁面に集め、スタンドにセットした状態のまま上精を新しいチューブに回収した。

## 【0059】

回収された大腸菌のゲノムDNAは、定法に従って、アガロース電気泳動と260/280 nmの吸光度測定を行い、その品質(低分子核酸の混入量、分解の程度)と回収量を検定した。本実施例では約9 $\mu$ gのゲノムDNAが回収され、ゲノムDNAのデグラデーションやrRNAの混入は認められなかった。回収したゲノムDNAは、最終濃度50 ng/ $\mu$ lとなるようにTE緩衝液に溶解し、以下の実施例に使用した。

## 【0060】

## (3) DNAアレイの作製

## [3-1] ガラス基板の洗浄

合成石英のガラス基板(サイズ：25mm×75mm×う1mm、飯山特殊ガラス社製)を耐熱、耐アルカリのラックに入れ、所定の濃度に調製した超音波洗浄用の洗浄液に浸した。一晩洗浄液中で浸した後、20分間超音波洗浄を行った。続いて基板を取り出し、軽く純水ですすいだ後、超純水中で20分超音波洗浄を行った。次に80℃に加熱した1N水酸化ナトリウム水溶液中に10分間基板を浸した。再び純水洗浄と超純水洗浄を行い、DNAアレイ用の石英ガラス基板を用意した。

## 【0061】

## [3-2] 表面処理

シランカップリング剤KBM-603(信越シリコーン社製)を、1%の濃度となるように純水中に溶解させ、2時間室温で攪拌した。続いて、先に洗浄したガラス基板をシランカップリング剤水溶液に浸し、20分間室温で放置した。ガラス基板を引き上げ、軽く純水で表面を洗浄した後、窒素ガスを基板の両面に吹き付けて乾燥させた。次に乾燥した基板を120℃に加熱したオーブン中で1時間ベークし、カップリング剤処理を完結させ、基板表面にアミノ基を導入した。次いで同仁化学研究所社製のN-マレイミドカブロイロキシスクシミド(N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido)(以下EMCSと略す)を、ジメチルスルホキシドとエタノールの1:1混合溶媒中に最終濃度が0.3mg/mlとなるように溶解しEMCS溶液を用意した。ベークの終了したガラス基板を放冷し、調製したEMCS溶液中に室温で2時間浸した。この処理により、シランカップリング剤によって表面に導入されたアミノ基とEMCSのスクシミド基が反応し、ガラス基板表面にマレイミド基が導入された。EMCS溶液から引き上げたガラス基板を、先述のEMCSを溶解した混合溶媒を用いて洗浄し、さらにエタノールにより洗浄した後、窒素ガス雰囲気下で乾燥させた。

## 【0062】

## [3-3] プライマー

(1)で述べた固相固定用プライマー(Ec1~Ec7)をそれぞれ純水に溶解し、最終濃度(後記溶解時)10 $\mu$ Mとなるように分注した後、凍結乾燥を行い、水分を除いた。

## 【0063】

## [3-4] BJプリンターによるプライマーDNA吐出、および基板への結合

グリセリン7.5wt%、チオジグリコール7.5wt%、尿素7.5wt%、アセチレノールEH(川研ファインケミカル社製)1.0wt%を含む水溶液(混合溶媒)を用意した。続いて、先に用意した7種のプライマーを上記混合溶媒に規定濃度なるようにそれぞれ溶解した。得られたDNA

溶液をバブルジェットプリンター(商品名：BJF-850 キヤノン(株)製)用インクタンクに充填し、印字ヘッドに装着した。

【0064】

なお、ここで用いたバブルジェットプリンターは平板への印刷が可能なように改造を施したものである。またこのバブルジェットプリンターは、所定のファイル作成方法に従って印字パターンを入力することにより、約5ピコリットルのDNA溶液を約120マイクロメートルピッチでスポットティングすることが可能となっている。

【0065】

続いて、この改造バブルジェットプリンターを用いて、1枚のガラス基板に対して、印字操作を行い、DNAアレイを作製した。印字が確実に行われていることを確認した後、30分間加湿チャンバー内に静置し、ガラス基板表面のマレイミド基と核酸プライマー末端のチオール基とを反応させた。

【0066】

【3-5】洗浄

30分間の反応後、100mMのNaClを含む10mMのリン酸緩衝液(pH 7.0)により表面に残ったDNA溶液を洗い流し、ガラス基板表面に一本鎖DNAが固定したDNAアレイを得た。

【0067】

(4) 固相PCR

大腸菌ゲノムDNAの増幅方法を以下に示す。

【0068】

【表1】

Premix PCR 試薬 (TAKARA ExTaq)	25 $\mu$ l
Template 大腸菌ゲノム DNA	2 $\mu$ l(10 ng)
プライマー EcAP	2 $\mu$ l(20 pmole)
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>21 <math>\mu</math>l</u>
Total	50 $\mu$ l

【0069】

前述のプライマーアレイのプライマー結合部位をカバーし、且つ温度コントロールが可能なマイクロチャンバーを作製し、上記組成の反応液を該チャンバー内に封止して、以下のプロトコールに従って、増幅反応を行った。即ち、95°C/10分の保持の後、92°C(変性)/45秒、55°C(アニーリング)/45秒および72°C(伸長)/45秒を1サイクルとして35サイクル、最後に72°C/10分保持した。

【0070】

【表2】

95 °C	10 分	35Cycles
92 °C	45 秒	
55 °C	45 秒	
72 °C	45 秒	
72 °C	10 分	

【0071】

反応終了後、チャンバー内に、二本鎖核酸共存下で蛍光が増強する色素SYBR(登録商標)GreenI(モレキュラープローブ社：商品名SYBR(登録商標) Green I nucleic acid gel s

tain 10,000×concentrate in DMSO)をあらかじめ純水で200倍に希釈した溶液1  $\mu$ lを加えて、プライマーアレイを65°C／3分間→92°C／2分間→45°C／3時間の条件下におき、ハイブリダイゼーションを行った。

#### 【0072】

次に、プライマーアレイを2×SSC／0.1% SDS(25°C) 2分間→2×SSC (20°C) 2分間→純水(10°C) 2分間の条件で洗浄し、チャンバーから取り出して乾燥した。

#### 【0073】

##### (5) 蛍光測定

ハイブリダイゼーション反応終了後のDNAアレイをDNAアレイ用蛍光検出装置(Axon社製、GenePix 4000B)を用いて蛍光測定を行った(励起波長532 nm、フォトマル電圧400V)。測定結果を表1に示す。なお本実施例では、全ての操作を2回実施したのでそれぞれの結果を表1に示した。

#### 【0074】

##### 【表3】

表1

プライマー No.	蛍光輝度	
	1回目	2回目
1	8700	8500
2	9100	9050
3	7750	7650
4	11000	11000
5	10400	10550
6	7400	7400
7	5900	6000

#### 【0075】

表1中の蛍光輝度の数値は、ピクセル平均輝度(解像度5  $\mu$ m)を示した。表1で明らかのように、大腸菌から抽出したゲノムDNAを固相ユニバーサルPCRで増幅した結果を再現性よく検出することが可能であった。

#### 【0076】

##### 実施例2(固相ユニバーサルPCR II)

固相PCR時に実施例1で用いたプライマーに加えて、下記塩基配列を有するセンス側配列の共通プライマーの(EcSP)をアンチセンス側共通プライマーと同濃度で用いた以外は、実施例1と同様の方法で、固相PCRおよび蛍光検出を行った。

EcSP 5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3' (配列番号：9)。

#### 【0077】

実施例2では、固相PCRのサイクル数が31回で、実施例1とほぼ同様の結果を得た。これにより、センス側、アンチセンス側双方の共通プライマーを溶液中に共存させることで、固相PCRの効率の向上を図ることが可能であることが示された。

#### 【0078】

##### 実施例3(固相マルチプレックスユニバーサルPCR I)

##### (1) プライマーの準備

本実施例では実施例1で検出した大腸菌と同時に緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa : ATC

C#10145)のrRNAのゲノムDNAを検出する。そのために最初に緑膿菌用のチオール化センス側配列プライマー8種(Pa1～Pa8)を実施例1と同様に合成した。該プライマーの塩基配列を以下に示した。

Pa1 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGATCTTC 3'	(配列番号：10)
Pa2 5' TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC 3'	(配列番号：11)
Pa3 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'	(配列番号：12)
Pa4 5' GTACGGTAGAGGGTGGATTTTC 3'	(配列番号：13)
Pa5 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'	(配列番号：14)
Pa6 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACCTTC 3'	(配列番号：15)
Pa7 5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'	(配列番号：16)
Pa8 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'	(配列番号：17)。

### 【0079】

また、アンチセンス側配列の共通プライマーの塩基配列として下記塩基配列(PaAP)を選択した：

PaAP 5' ATCCAGCCGCAGGTTCCCCTAC 3' (配列番号：18)。

### 【0080】

#### (2) 蛍光検出

緑膿菌ゲノム抽出、大腸菌プライマーおよび緑膿菌プライマーを搭載したDNAマイクロアレイの作製、固相PCR(大腸菌ゲノムDNAおよび緑膿菌ゲノムDNA：それぞれ10ng、EcAPおよびPaAP：それぞれ20 pmole)、ハイブリダイゼーション、洗浄等を実施例1と同様に行い、蛍光による検出を行った。その結果を表2に示す。

### 【0081】

#### 【表4】

表2

プライマー No.	蛍光輝度	
	大腸菌	緑膿菌
1	5800	300
2	6050	550
3	5150	1700
4	7400	650
5	6900	1600
6	4900	2650
7	3900	600
8	-	350

### 【0082】

表2から固相マルチプレックスユニバーサルPCRによって大腸菌と緑膿菌との双方のrRNAゲノムの設定したプライマー配列が全て同時に検出されたことが示された。

### 【0083】

実施例4(固相マルチプレックスユニバーサルPCR II)

固相PCR時に実施例2で用いたプライマーに加えて、大腸菌と緑膿菌とのそれぞれのセンス側配列の共通プライマー(EcSPおよびPaSP)を同濃度で用いた以外は、実施例3と同

様の方法で固相PCRおよび蛍光検出を行った。以下にPaSPの塩基配列を示す。  
 PaSP 5' GCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3' (配列番号: 19)。

## 【0084】

実施例4では、固相PCRのサイクル数が数回程度少ない条件で、実施例3とほぼ同様の結果を得た。これにより、固相マルチプレックスユニバーサルPCRにおいてもセンス側、アンチセンス側双方の共通プライマーを溶液中に共存させることで、固相PCRの効率の向上を図ることが可能であることが示された。

## 【0085】

実施例5(取り込み標識固相ユニバーサルPCR)

実施例1と全く同様の方法により大腸菌ゲノム抽出、プライマーの合成、プライマーレイの作製を行った後、下記の組成のPCR溶液を用いて固相PCRを遂行した。

## 【0086】

## 【表5】

Premix PCR 試薬(TAKARA ExTaq)	25 $\mu$ l
Template 大腸菌ゲノム DNA	2 $\mu$ l (10 ng)
プライマー EcAP	2 $\mu$ l (20 pmole)
Cy-3 dUTP (アマシャムバイオサイエンス社: 1 mM)	2 $\mu$ l (2 nmol)
<u>H<sub>2</sub>O</u>	<u>19 <math>\mu</math>l</u>
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

## 【0087】

次いで、プライマーレイをハイブリダイゼーション条件におくことなく、2×SSC/0.1% SDS(92°C) 2分間→ 2×SSC/0.1% SDS(92°C) 2分間→ 2×SSC/0.1% SDS(25°C) 2分間→ 2×SSC (20°C) 2分間→ 純水(20°C) 2分間の条件で洗浄し、チャンバーから取り出して乾燥した。

## 【0088】

次いで実施例1と同様に蛍光検出を行った。結果を表3に示す。

## 【0089】

## 【表6】

表3

プライマー No.	大腸菌
	蛍光輝度
1	11500
2	11900
3	10000
4	14800
5	13200
6	9500
7	7700

## 【0090】

本発明における検出方法に従い、固相ユニバーサルPCR時に取り込み標識を採用し蛍光検出を行ったところ、表3に示すように簡便に蛍光検出がされた。従ってハイブリダイゼーション工程を必要としない蛍光検出が可能であることが示された。

## 【0091】

## 実施例6

実施例5の取り込み標識を用いて、実施例2から4の固相ユニバーサルPCR、あるいは固相マルチプレックスユニバーサルPCRを行い、蛍光強度はそれぞれ実施例2から4とは異なるものの、結果として大腸菌のrRNAゲノムDNA、あるいは大腸菌と緑膿菌との双方のrRNAゲノムDNAの同時検出が可能であることが示された。

## 【0092】

## 実施例7(共通プライマー標識固相ユニバーサルPCR)

共通プライマーEcAPをテトラメチルローダミン標識し、ハイブリダイゼーションをSYBR green等の蛍光色素を共存させずに行い、蛍光検出を上記テトラメチルローダミンを用いて行うこと以外は実施例1と全く同様の方法により固相ユニバーサル法による大腸菌ゲノムDNAの検出をおこなった。以下にテトラメチルローダミン標識EcAPの構造を示す。

5' Rho-CONH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OP(O<sub>2</sub>)<sub>0-d</sub> ATCCAACCGCAGGTTCCCCTAC 3' (配列番号：20)  
(Rho=テトラメチルローダミン)。

## 【0093】

結果、蛍光強度に差は観察されるものの実施例1とほぼ同様の結果が得られた。

## 【0094】

アンチセンス側配列の共通プライマーを標識する方法、実施例2～4の方法においても実施を試みたが、いずれも有効であるとの結果を得ることができた。

## 【図面の簡単な説明】

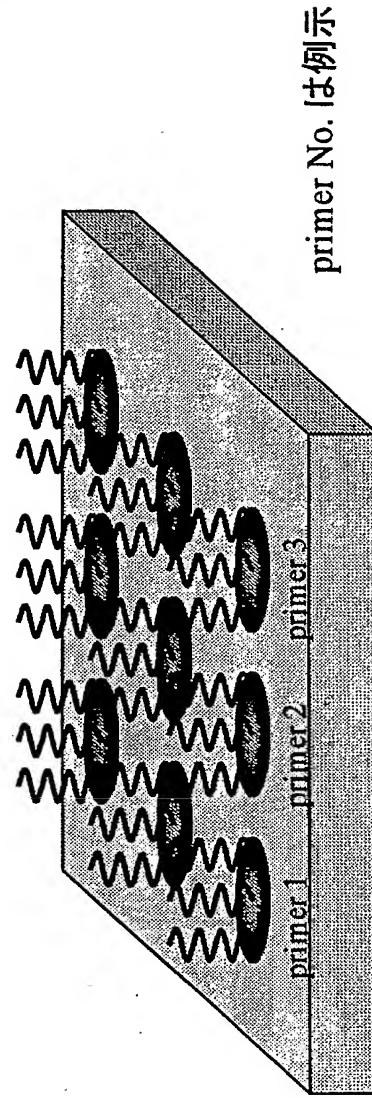
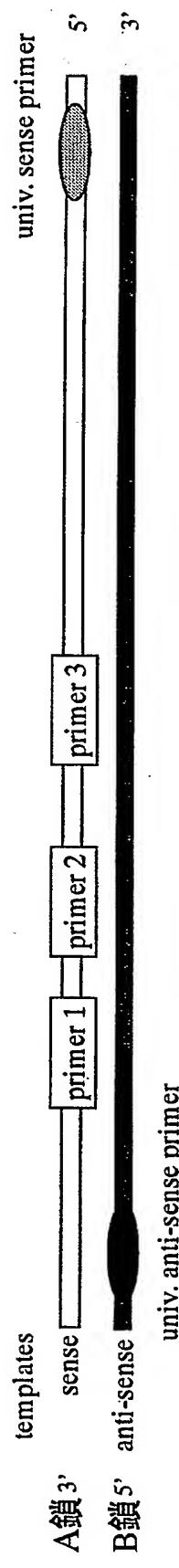
## 【0095】

【図1】本発明における固相ユニバーサルPCRを説明するための模式図である。

【図2】本発明における固相ユニバーサルPCRおよび取り込み標識を説明するための模式図である。

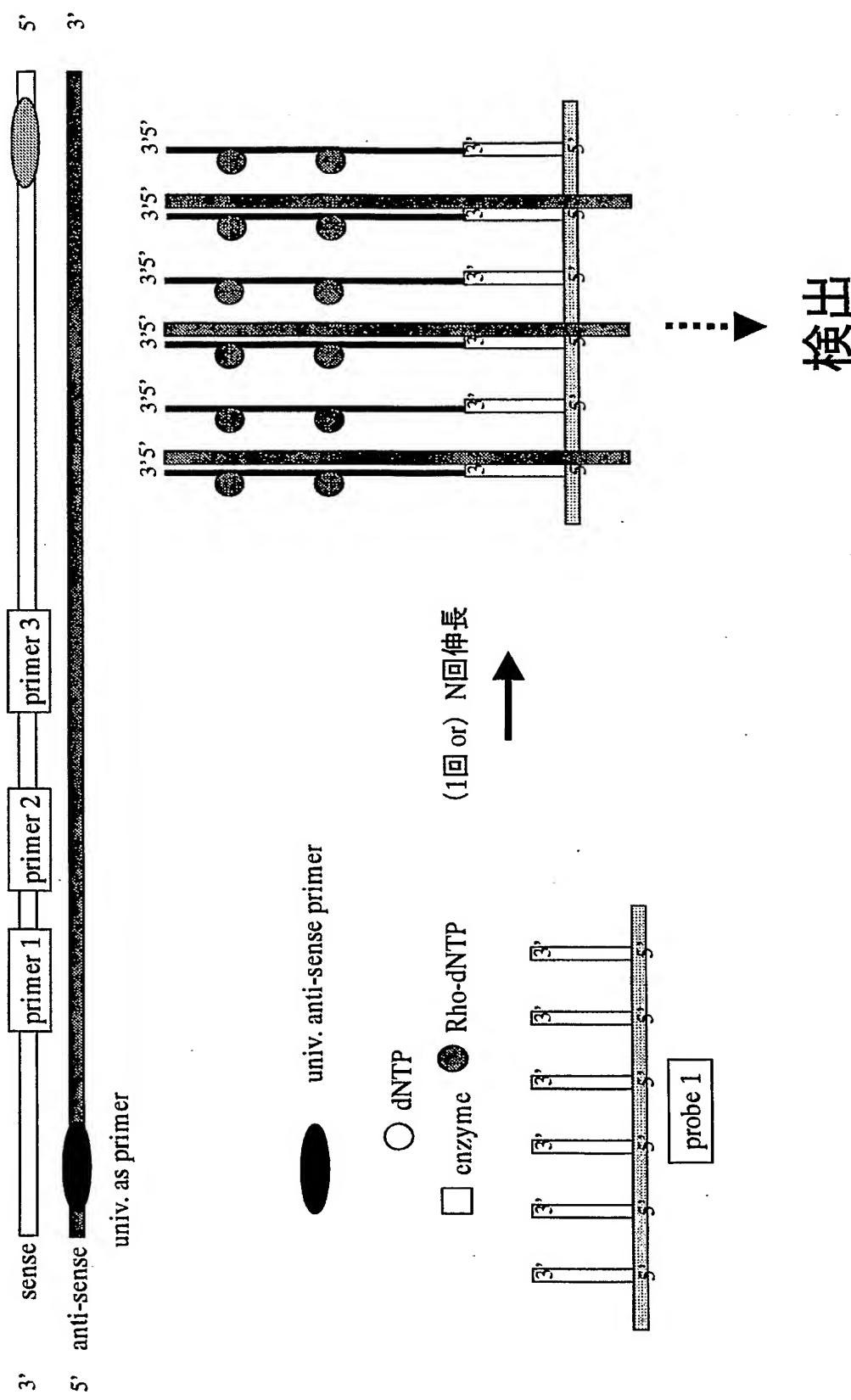
【書類名】 図面  
【図 1】

# 遺伝子 (templates) とプライマーハーフアレイ



プライマーハーフアレイ (DNAチップ)

【図 2】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 多種多様の遺伝子検出を簡便、高効率、高精度に行うことを可能とし、遺伝子検出をベースとした分野で広範囲に利用されうる核酸の検出方法を提供する。

【解決手段】 核酸アレイを用いた、固相ユニバーサルP C R、固相マルチプレックスP C R、さらにユニバーサルでありますマルチプレックスである固相P C Rを可能とする核酸の検出方法を提供する。

【選択図】 図1

特願 2004-070986

出願人履歴情報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日

[変更理由]

住 所

氏 名

1990年 8月30日

新規登録

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

キヤノン株式会社